

NBR 85JP-170287

-1- (WPAT)

Title - Hyaluronic acid prodn. by culture of e.g. Streptococcus pyogenes - includes maintaining medium viscosity below 200 cps. to increase yield

Patent Assigned to: - (KYOW ) KYOWA HAKKO KOGYO KK

Priority- 85.08.01 85JP-170287

NUM - 1 patent(s) 1 country(s)

Patent Number -- JP62032893 A 87.02.12 \* (8712)

AP -- 85JP-170287 85.08.01

IC2 - C12P-019/04 C12R-001/46

Abstract - JP62032893 A

In the prodn. of hyaluronic acid by culturing bacteria capable of producing hyaluronic acid the viscosity of the culture medium is kept under 200 cps. by adding the same medium intermittently or continuously. Hyaluronic acid is produced in the culture medium and collected. Pref. bacteria are Streptococcus pyogenes, Streptococcus equi., Streptococcus equisimilis, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus zooepidemicus. The bacteria are cultured in a medium contg. carbon sources, nitrogen sources and inorganic salts under aerobic condition at 33-38 deg. C. During the culture, the same medium (1-10 times diluted) is added to the culture to lower the viscosity. Two methods, semicontinuous method and continuous method, are used. In the semicontinuous method, when the viscosity reaches 100-150 cps. a part (20-80%) of the culture medium is removed and the same volume of the same medium (1-10 times diluted) is added. In the continuous method the same medium (1-10 times diluted) is continuously added and the same volume of the culture medium is removed simultaneously.

Pref. hyaluronic acid is collected from the culture medium by conventional purification method for polysaccharides.

USE/ADVANTAGE - The yield of hyaluronic acid from glucose used as a source material is 23% while 7.5% in the conventional bath method due to the viscosity of the culture medium being kept under 200 cps. resulting in the medium being well stirred.

発明が解決しようとする問題点

従来行われている回分培養法では、ヒアルロン酸が蓄積するにつれて、培養液の粘度が著しく増加し、攪拌が不十分で、ヒアルロン酸の蓄積量増加は困難になり、対菌収率は10%以下で生産性が悪くなる。従って、従来法では工業的に安価なヒアルロン酸の製造が困難であり、ヒアルロン酸の新規製造法の開発が望まれている。

問題点を解決するための手段

本発明者らは、微生物の培養によるヒアルロン酸の製造において、培養液の粘度を200cps以下に調整して培養すればヒアルロン酸の生産を向上できること、およびその粘度の維持が半連続または連続式培養によって達成できることを見出し本発明を完成した。

以下に、本発明を詳細に説明する。

本発明はヒアルロン酸生産能を有する微生物を培養してヒアルロン酸を製造する方法において、培養中、間欠的または連続的に培地を供給し、培養液の粘度を200cps以下になるように維持しつつ培養を行い、培養液中にヒアルロン酸を蓄積させ、これを採取することを特徴とするヒアルロン酸の製造法を提供する。

本発明方法において、培養液の粘度を200cps

(Bergey's Manual of Determinative Bacteriol.) 491, 1974) のA群およびC群のストレプトコッカス属菌種、例えば、ストレプトコッカス・ピオゲネス、ストレプトコッカス・エキイ、ストレプトコッカス・エキイシミリス、ストレプトコッカス・ディスガラクティアエ、ストレプトコッカス・ゾーエピデミクスなどが用いられる。とくに好適にはストレプトコッカス・ゾーエピデミクス(*Streptococcus zooepidemicus*) NCTC 7023 が用いられる。

本発明に用いる培地としては、炭素源、窒素源、無機物、その他の栄養物を適当に含有する培地ならば、合成培地、天然培地のいずれも使用可能である。

炭素源としてはグルコース、シュクロース、乳糖、各種でん粉糖化液、セルロース糖化液などが使用できる。窒素源としては、ペプトン、ポリペプトン、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、ブレイン・ハート・インヒュージョン、馬血清などの有機栄養源、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩酸アンモニウム、アンモニアなどが使用できる。無機塩としては、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、

以下に維持するためには、培養液の一部を培養液から抜き出し、それとほぼ等容量の培地を補充添加して培養を続ける半連続培養法、または培地を連続的に供給する一方供給量と、容量の培養液を連続的に培養槽から取り出すようにして培養を続ける連続培養法による。

半連続培養法の場合、培養液の粘度が100~150cpsに達した時点で培養液の一部(20~80%)を抜き取り、それと等容量の培地(初発培地の1/10~1倍濃度の培地)を補充添加して培養を行う。連続培養法の場合は、培養液の粘度が100~150cpsになるように、培地(初発培地の1/10~1倍濃度の培地)を連続的に供給し、供給量と等容量の培養液が発酵槽外に出るように制御して培養を行う。

培養液の粘度は、回転式B型粘度計(No. 3, 60 rpm, 30℃)で測定する。また、ヒアルロン酸の測定は、硫酸-カルパソール法(東大出版会編「還元糖の定量法」, 57~59, 1969)で行う。

本発明に使用される微生物としては、ヒアルロン酸を菌体外に蓄積する菌種であればいずれも使用可能であるが、とくにランセフィールド(Lancefield)による血清学的分類(バーゾース・マニユアル・オブ・デタミネイティブ・バクテリアロジー

硫酸第一鉄、硫酸マンガ、塩化カルシウム、炭酸カルシウムなどが用いられる。その他の微量要素として各種のビタミン、例えばチアミン、ニコチン酸、ピチオン、パントテン酸などが用いられる。

使用菌種が好気性の菌種であるので、通常の好気性菌の培養に比べてかなりの低通気条件または低攪拌条件の培養が適している。培養温度は25~42℃、好ましくは33~38℃が適当である。培養時のpHは5~9、好ましくは7前後に保持する。pHの調整には通常のアモニア水、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどが用いられる。

ヒアルロン酸の分離には従来から行われている多種類の分離採取法を用いることができる。遠心分離により菌体を除去し、トリクロル酢酸またはクロロホルムとイソアミルアルコールの混液で蛋白質の除去を行った後、2倍のエタノールを添加してヒアルロン酸を沈澱させる。沈澱物を水に溶解させ不溶物を除去し、低分子物質を透析、限外濾過などにより除去し、有機溶媒による再沈澱を繰り返してヒアルロン酸を単離することができる。

本発明による半連続および連続培養法が、回分培養法に比べて優れている点は、以下の通りであ

る。

- (1) 使用した糖質原料当りの収率、時間当りの生産速度が高い。
- (2) 培養液の粘度が低く抑えられているため、攪拌が充分行われる。
- (3) グルコースの濃度が低く抑えられているため、微生物の培養およびヒアルロン酸の生成に効果的である。
- (4) 一つの発酵槽で長時間培養が可能である。従って、一定量のヒアルロン酸を取得するのに必要な操作を簡略化できる。

以下に本発明の実施例を示す。

#### 実施例 1.

菌株として、ストレプトコッカス・ズーエビデミクス NCTC 7023 を用いた。

ブレイン・ハート・インヒュージョン寒天培地（日本製薬社製）で 37℃、16 時間培養した菌体を、グルコース 1%、ペプトン 1.5%、酵母エキス 0.5%、コーンステープリカー 1%、グルタミン酸ナトリウム 0.3%、リン酸第二カリウム 0.2%、硫酸マグネシウム 0.05%、チオ硫酸ナトリウム 0.1% の組成の培地（pH 7.0）400 ml を入れた 2 l 容三角フラスコをオートクレーブで殺菌したものに接種し、別に殺菌した炭酸カル

シウムを 2% の濃度になるように添加して 37℃、200 rpm で 12 時間振盪培養した。これを第 1 次種培養とした。上記組成の培地 3 l を入れた 5 l 容のジャーファーマンターをオートクレーブ殺菌し、それに第 1 次種培養を 5% の濃度になるように接種し、通気量 0.3 vvm、攪拌数 200 rpm、温度 37℃、培養液の pH を 6N-水酸化ナトリウムで中和しながら 6 時間培養した。これを第 2 次種培養とした。上記培地組成のグルコース 1% を 2% に変えた培地 20 l を入れた 30 l 容ジャーファーマンターをオートクレーブ殺菌し、それに第 2 次種培養を 5% の濃度になるように接種し、第 2 次種培養と同条件で培養を行った。

培養開始 5 時間後に菌体生育はほぼ定常期に達し、培養液の粘度は 150 cps、ヒアルロン酸の蓄積量は 2.5 g/l であった。その時点で、培養液の 1/5 量すなわち 10 l を発酵槽から抜き取り、殺菌した以下の組成の液 10 l を発酵槽に供給し培養を続けた。

グルコース	1%
ペプトン	0.1%
酵母エキス	0.05%
コーンステープリカー	0.5%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.02%

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01%

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.02%

以後 16 回、培地の粘度が 150 cps に達した時点で上記の操作を繰り返し培養を続行した。

得られた結果および対照として行った回分培養法の場合の結果を第 1 表に示す。

第 1 表

		半連続培養法			回分培養法		
		初発量	供給量	全量	初発量	7 時間目添加量	全量
主な培養基成分 (g)	グルコース	400	1600	2000	1200	800	2000
	ペプトン	300	160	460	300	100	400
	酵母エキス	100	80	180	100	50	150
	コーンステープリカー	300	800	1100	200	200	400
培養時間 (時)		29			34		
培養液粘度 (cps)		150			2700		
ヒアルロン酸 (g)		460			150		
対グルコース収率 (%)		23.0			7.5		

#### 実施例 2.

連続的に培地の供給および培養液の抜き出しが

できる 30 l 容ジャーファーマンターを用いて、実施例 1 と同様の条件で培養を行った。

培養開始 4 時間後から培養液の粘度が 140 cps に保たれるように殺菌した以下の培地の添加および培養液の抜き出しを行った。

グルコース	1%
ペプトン	0.1%
酵母エキス	0.05%
コーンステープリカー	0.5%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.02%
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01%
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.02%

培地添加速度は 7.2 l/時、媒体量は 20 l、従って希釈率は 0.36/時、平均滞留時間は 2.8 時間で 34 時間連続培養を行った。

得られた結果および対照として行った回分培養法の場合の結果を第 2 表に示す。

第 2 表

		連続培養法			回分培養法		
		初発量	供給量	全量	初発量	7時間目 添加量	全量
主な 栄養 基質 (g)	グルコース	400	2160	2560	1200	800	2000
	ペプトン	300	216	516	300	100	400
	酵母エキ	100	108	208	100	50	150
	コンスタート リザー	300	1080	1380	200	200	400
培養時間 (時)		34			34		
培養液粘度 (cPs)		140			2700		
ヒアルロン酸 (g)		565			150		
対グルコース収率 (%)		22.1			7.5		

発明の効果

本発明方法によれば、ヒアルロン酸を極めて効率よく安価に供給することができる。

特許出願人 (102) 協和 醗酵工業株式会社

代表者 加 藤 幹 夫

